

Aus der I. Inneren Abteilung des Städt. Krankenhauses
Berlin-Neukölln (Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. K. Holldack)
und
aus dem Institut für Hämatologie der GSF, Assoziation mit
Euratom München (Leiter: Prof. Dr. W. Stich)

DIE WIRKUNG DER THIOCTSAURE AUF DIE PROLIFERATION VON KNOCHENMARK IN KULTUREN

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an den

Medizinischen Fachbereichen der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Matthias Scheel

aus Berlin

1972

Aus der I. Inneren Abteilung des Städt. Krankenhauses
Berlin-Neukölln (Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. K. Holldack)
und
aus dem Institut für Hämatologie der GSF, Assoziation mit
Euratom München (Leiter: Prof. Dr. W. Stich)

DIE WIRKUNG DER THIOCTSAURE AUF DIE PROLIFERATION VON KNOCHENMARK IN KULTUREN

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an den

Medizinischen Fachbereichen der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Matthias Scheel

aus Berlin

Referent: Professor Dr. med Irene Boll

Korreferent: Professor Dr. med. K. E. Hampel



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 11. 11. 1972

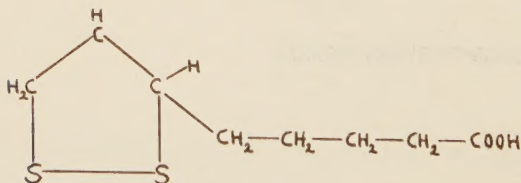
G l i e d e r u n g

	Seite:
A. LITERATURÜBERBLICK	2
B. METHODE	11
C. ERGEBNISSE	21
a) Reifungskurven	
b) Mitose-Indices	
c) Karyologische Kurven	
d) G/E - Index	
D. DISKUSSION	47
E. ZUSAMMENFASSUNG	51
F. LITERATURVERZEICHNIS	52

A. LITERATURÜBERBLICK

Seitdem es gelungen ist, Erkrankungen, die auf einem Vitaminmangel beruhen, zu heilen oder eine Mangelerkrankung durch prophylaktische Vitamingaben zu verhindern, wurden weitere Anstrengungen unternommen, um neuartige Substanzen von vitaminartigem Charakter aus tierischem oder pflanzlichem Gewebe zu isolieren. So haben sich eine Reihe von Substanzen, die das Wachstum von Mikroorganismen, Bakterien und Protozoen in katalytischen Mengen sehr stark fördern, auch für den tierischen und menschlichen Organismus als wirksam erwiesen.

Von DEWEY⁽¹⁰⁾ wurde 1941 aus Lebergewebe ein Stoff isoliert, der nur in Fettlösungsmitteln löslich war und von ihm zunächst der "lipotrope factor" genannt wurde. Inzwischen wissen wir, daß es sich um die α -Liponsäure handelte, die auch Thioctsäure genannt wird.



1,2 Dithia - cyclopentan - 3 - valeriansäure

Die Darstellung der Thioctsäure aus Leber gelang erstmals REED⁽²⁴⁾ im Jahr 1951. Es wurden fast 10 t menschlicher Leber aufbereitet, um 30 mg kristallisierte α -Liponsäure zu isolieren. Nachdem auch die Strukturaufklärung durch REED⁽²⁵⁾ erfolgt war, konnte die hierbei zunächst vermutete zyklische Verbindung durch Synthese bestätigt werden. Diese Synthese der α -Liponsäure führte BULLOCK⁽⁷⁾ zuerst durch.

In der oxydierten Form liegt die Thioctsäure als 1,2 Dithia-cyclopentan - 3 - valeriansäure vor, in der reduzierten Form hingegen handelt es sich um eine nicht zyklische Verbindung, die 6,8 Dithio - octansäure. Von dieser reduzierten Form leitet sich der heute gebräuchliche Name Thioctsäure ab. Die Kurzschreibform der Thioctsäure lautet bei uns TS.

Aus der chemischen Konstitution der TS geht hervor, daß es sich um eine interessante biologische Substanz handeln muß. Schon GOEDDE⁽¹²⁾ weist auf die enge Abhängigkeit zwischen chemischer Zusammensetzung und biologischer Aktivität hin. Im Hinblick auf die TS berichtet CALVIN⁽⁹⁾ von der im 5-gliedrigen Disulfidring vorhandenen Ringspannung, die auf eine beträchtliche biologische Aktivität hindeutet. Die Untersuchungen von GUIRARD⁽¹⁵⁾ mit Bakterienkulturen ließen die Bedeutung der TS und ihre Zuordnung in das biologische Stoffwechselgeschehen erkennen. Zum Wachstum

einiger Milchsäurebakterienarten ist die Anwesenheit von Essigsäure nötig. Als statt Essigsäure die TS zugesetzt wurde, kam es auch zum Wachstum dieser Mikroorganismen. Die in nur geringer Menge zugesetzte TS kam nicht als Ausgangssubstrat für die Essigsäurebildung in Frage, vielmehr mußte die TS als Kofaktor beteiligt sein und wurde deshalb zunächst "acetate replacing factor" genannt.

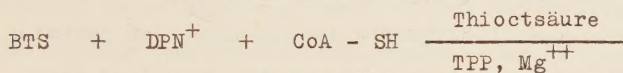
Durch weitere Kulturversuche mit Bakterien gelang es O'KANE und GUNSALUS⁽¹⁸⁾, den Wirkstoff TS in einen biochemischen Zyklus einzuordnen. Die Oxydation der Brenztraubensäure (= BTS) durch den *Streptococcus faecalis* war nur möglich, wenn ein aus Hefe isolierter Faktor der Bakterienkultur beigegeben war. Dieser "pyruvate oxydation factor" ist mit der TS identisch und dient als Kofaktor dem oxydativen Abbau der BTS.

Auch das Wachstum einzelliger Lebewesen wird durch TS gefördert. PATTERSON und STOKSTAD⁽²⁰⁾ isolierten aus Lebergewebe einen für das Protozoon *Tetrahymena geleii* essentiellen Wachstumsfaktor, den sie "Protogen" nannten. Es handelt sich ebenfalls um TS, die für diesen Einzeller einen unentbehrlichen wachstumsfördernden Faktor darstellt und somit eine vitaminähnliche Funktion hat.

GUNSALUS⁽¹⁶⁾ lokalisiert den Wirkbereich der TS in das Oxydationssystem der BTS zwischen Cocarboxylase (=Thiaminpyrophosphat, Aneurin) und Coenzym A. Thiocetsäure kataly-

siert die Acetylierung des Coenzym A und ist damit an der Synthese energiereicher S-Acetylderivate beteiligt. Mit der Bildung des Acetyl - S - Coenzym A (=aktivierte Essigsäure) ist ein Stoffwechselzwischenprodukt entstanden, das für den Ablauf des Krebs-Zyklus, für die Umwandlung der Kohlenhydrate in Fettsäuren sowie für die Biosynthese der Steroide unentbehrlich zu sein scheint.

Im Abbau der BTS zu aktivierter Essigsäure ist neben dem Thiaminpyrophosphat (= TPP), dem Diphosphopyridinnucleotid (= DPN⁺), dem Coenzym A und Mg⁺⁺ die Thioctsäure beteiligt.



Der erste Schritt der BTS-Decarboxylierung wird durch die Bildung eines Acetaldehyd-TPP-Komplexes eingeleitet. Dieser Komplex wird anschließend auf die Thioctsäure übertragen, nachdem sich der Disulfidring der TS geöffnet hat⁽¹³⁾.

Die nun entstandene S - Acetyl - Dihydroliponsäure - eine thioesterartige Verbindung - stellt einen wichtigen Energielieferanten der Zelle dar. Die Übertragung der Acetylgruppe auf das Coenzym A wird von der Liponsäure-Transacetylase katalysiert⁽⁶⁾. Im reduzierten Zustand bleibt die Thioctsäure zurück. Der Zyklus schließt sich, indem die Regeneration zur oxydierten TS durch eine an DPN⁺

gebundene substratspezifische Liponsäure-Dehydrogenase erfolgt⁽¹²⁾.

Aus dem Reaktionsablauf geht hervor, daß die TS zunächst in der Disulfidform und dann in der Dithiolform vorliegt. Für die TS wurde das Oxydo-Reduktionspotential der Disulfid-Dithiolform bestimmt. SANADI⁽³⁰⁾ stellte für die TS ein Redoxpotential von - 294 mV fest.

Inzwischen wurde TS als natürlich vorkommende Substanz in fast allen menschlichen Organzellen mit Ausnahme der Schilddrüse nachgewiesen. Lebergewebe zeigte dabei den höchsten Gehalt an Thioctsäure. Ihre große Verbreitung ließ eine besondere Wichtigkeit im Stoffwechselablauf vermuten.

Tierexperimentelle Beobachtungen an Küken und Ratten hatten zu der Annahme geführt, daß TS unter bestimmten Ernährungsbedingungen eine Förderung ihres Wachstums verursacht.

Umfangreiche Kontrollversuche zeigten jedoch, daß TS keinen essentiellen Nahrungsfaktor für höhere Tierspezies darstellt.

Es lag nahe, die neuartige Substanz nun auch klinisch anzuwenden. Eine Anwendbarkeit der TS bei Erkrankungen des Lebergewebes ergab sich aus dem Nachweis, daß bei entzündlichen Lebererkrankungen eine Verminderung des Thioctsäuregehaltes im Blut vorlag⁽¹⁹⁾. In einem mikrobiologischen Testverfahren fand TAKENOUCHI⁽³³⁾ bei Gesunden einen durchschnittlichen Gehalt an TS, der bei $15,8 \pm 3,5 \mu\text{g/ml}$ Serum lag.

Bei Leberschäden führt die Störung im Intermediärstoffwechsel u.a. zu einem Anstieg der Metaboliten BTS und α -Ketoglutaratsäure, während der Zitronensäurespiegel erniedrigt ist. Durch die Gabe von TS stellte REDETZKI⁽²⁶⁾ eine Normalisierung dieser Metabolitenveränderungen fest.

Die pharmakologischen Wirkungen der TS sind bisher nur an der Leberzelle gründlich untersucht worden. Im Leberregenerationstest zeigte PETZOLD⁽²¹⁾ den Einfluß der TS auf enzymatische Reaktionsvorgänge. Eine Aktivitätszunahme der alkalischen Gewebsphosphatasen unter TS-Zugabe soll demnach Ursache für die verstärkte Glykogeneinlagerung sein. Dafür spricht, daß BUTTURINI⁽⁸⁾ bei experimentell herbeigeführter Leberzellverfettung die Glykogenverarmung der Zellen durch die Gabe von TS verhinderte. TAKAHASHI⁽³²⁾ beseitigte durch TS den Verlust von Leberzelleiweiß, der durch eine experimentelle Schädigung bewirkt worden war. Gleichzeitig wurde durch die TS auch die Abnahme des Nucleinsäuregehaltes in den Leberzellmitochondrien gehemmt.

Auf die therapeutische Wirksamkeit der TS bei Vergiftung von Organzellen durch Schwermetalle weist GRUNERT⁽¹⁴⁾ hin. Eine durch Arsen bedingte Blockierung der sulfhydrylhaltigen Fermente in den Herzmuskelzellmitochondrien der Ratte war reversibel, wenn die freien SH-Gruppen der TS einen stabilen Komplex gebildet hatten⁽²⁷⁾.

Von einem Antiscorbut-Effekt der TS berichtet ROSENBERG⁽²⁸⁾. Bei Meerschweinchen, die so ernährt worden waren, daß sie typische Vitamin C - Mangelerkrankungen zeigten, wurden durch die Applikation von TS alle Mangelsymptome beseitigt als ob eine fast optimale Ascorbinsäurebehandlung erfolgt wäre. Da die Applikation von TS mit nur wenig Ascorbinsäure einen wirksameren Einfluß auf die Beseitigung der Vitamin C - Mangelerkrankungen zeigte als die alleinige Gabe von Ascorbinsäure, nimmt ROSENBERG an, daß TS auf das Vitamin C einen Schutzeffekt ausübt, indem es seine Oxydation verhindert.

Über die erste klinische Anwendung der Thioctsäure bei einem Koma hepaticum berichtete RAUSCH⁽²³⁾. Das komatöse Zustandsbild wurde vorübergehend beseitigt, wenn täglich etwa 6 mg TS verabreicht worden waren. DONATELLI⁽¹¹⁾ vermutet, daß durch TS ein bei Leberkoma geschädigtes Ferment-system wieder aktiviert wird. An einem weiteren Stoffwechsel-geschehen kann seiner Meinung nach die TS kaum teilnehmen, da sie bei parenteraler Zufuhr schon nach etwa zwei Stunden renal ausgeschieden wird. Nach anfänglich auch von anderen Klinikern (31) (34) beschriebenen Erfolgen in der Behandlung entzündlich bedingter Lebererkrankungen wurde es um die TS bald wieder still. Erst in jüngster Zeit wurde die Anwendung der Thioctsäure in der Lebertherapie wieder empfohlen. MÜLLER⁽¹⁷⁾ weist darauf hin, daß die Erhöhung

der täglichen Gesamtdosis auf 100 mg TS von wesentlicher Bedeutung zu sein scheint um die Leberkrankheiten zu bessern, für die der Alkoholabusus ursächlich verantwortlich gemacht wird.

Bei der Durchsicht der Literatur über die Möglichkeiten der Anwendbarkeit von Thioctsäure fanden einige Beobachtungen von RAUSCH⁽²²⁾ unser Interesse. Mehrere dekompensierte perniciöse Anämien wurden von ihm mit TS behandelt. Eine Perniciosa reagierte sowohl mit einem Anstieg der Retikulozytenwerte als auch mit einer Vermehrung der Erythrozytenzahlen von 2,4 auf 3,1 Mill./mm³. Eine andere perniciöse Anämie zeigte eine leichte Retikulozytenkrise (9 % auf 41 %) und einen Anstieg der Leukozytenzahlen von 5900 auf 7000, während die Zahl der Erythrozyten und der Hämoglobinwert unbeeinflusst blieben.

Die Blutbildveränderungen, die RAUSCH auch bei Anämien anderer Genese mit der täglichen Gabe von etwa 5 mg TS erzielte, sind seiner Meinung nach mit denen zu vergleichen, wie sie durch Cortison- bzw. A.H.-Gaben erhalten werden.

Uns regten die Beobachtungen von RAUSCH an, zu untersuchen, ob Thioctsäure bei einer Reifungsstörung der Hämatopoese mit Erfolg therapeutisch anwendbar ist. Das Verfahren der Knochenmarkkultivierung schien uns geeignet, die durch einen Thioctsäure-Zusatz hervorgerufenen möglichen Änderungen im Reifungsverhalten der Erythrozyto- und Granulo-

zytopoese erkennen zu können. Die bisher nur über die Einwirkung der TS auf den Leberzellstoffwechsel durchgeführten Untersuchungen lassen sich nicht auf das blutbildende Gewebe übertragen. Die Hämatopoese zeichnet sich gerade gegenüber dem Lebergewebe mit der geringen Regenerationsfähigkeit durch ihre beträchtliche Teilungsaktivität aus, mit der sie für den notwendigen Nachschub an Blutzellen sorgt. Aus dem biochemischen Verhalten der Thioctsäure und ihrem Wirkungsbereich geht hervor, daß sie, in katalytischen Mengen einer Knochenmarkkultur zugesetzt, für eine Steigerung des Blutzellstoffwechsels durchaus in Frage kommen könnte. TS könnte aufgrund einer Schlüsselstellung im Kohlenhydrat-, Fett- und Eiweißstoffwechsel sowohl der Energiebereitstellung und der Ausreifung von Blutzellen dienen als auch bei gestörtem Stoffwechselablauf wirksam in den Intermediärstoffwechsel eingreifen.

B. METHODE

Um menschliches Knochenmark in der Kultur am Leben zu erhalten, benutzten wir die Carrel'sche Methode, modifiziert von ALBRECHT⁽¹⁾ und BOLL⁽³⁾. Zunächst wird das Blutplasma des Patienten mit Corrhormon und Hank'scher Lösung gemischt. Die Mischung gerinnt nur, wenn sie mindestens 33 - 40 % Plasma enthält. Auf ein Deckglas aufgebracht, bildet dieses Medium ein Koagulum; auf dieses wird das Knochenmarkbröckel gesetzt und mit Serum bedeckt. Ein hohlgeschliffener Objektträger und Paraffin verschließen die in Handsterilität angesetzte Kultur luftdicht.

Die Deckglaskulturen wurden in dieser Arbeit mit folgendem Zusatz angelegt:

1. Kontrollkulturen ohne Zusatz,
2. Kulturen mit 5 γ / ml Thioctacid im Koagulum,
3. Kulturen mit 50 γ / ml Thioctacid im Koagulum.

Die in dieser Arbeit benutzte Thioctsäure ist das heute einzige im Handel befindliche Reinpräparat: es wird unter dem Namen "Thioctacid ^R" von der Firma Homburg vertrieben. Da die Thioctsäure zur Zeit der Durchführung dieser Arbeit nur als kristallines gelbes Pulver verfügbar war, haben wir uns zunächst eine Stammlösung hergestellt. Unter sterilen Kautelen wägen wir das gelbe Pulver ab, brach-

ten es in Ather zur Lösung, vermischten es mit physiologischer NaCl-Lösung, verschlossen es luftdicht und hielten die so gewonnene Thioctsäure-Stammlösung fern von Lichteinwirkung, um eine leicht mögliche Polymerisation der Thioctsäure zu verhindern.

Von den Kulturen, die bei 37° C im Brutschrank belassen wurden, fertigten wir nach 24, 48 und 72 Stunden Ausstriche an. Zunächst an der Luft getrocknet, anschließend mit May-Grünwald- und Giemsa-Lösung nach Pappenheim gefärbt, wurden aus jedem Ausstrich-Präparat genau tausend Zellen einschließlich der Mitosephasen in mäanderförmiger Zählung erfaßt. Außerdem wurde direkt nach der Knochenmarkentnahme ein Originalausstrich angefertigt, ebenfalls gefärbt und ausgezählt.

Die Zellen wurden nach BOLL⁽⁴⁾ (5) differenziert.

In der Erythropoese auftretende Zellen:

Proerythroblasten,
basophile Erythroblasten,
polychromatische Erythroblasten,
oxyphile Erythroblasten,
reife Erythroblasten.

Bis auf die reifen Erythroblasten wurden alle aufgeführten Zellen als teilungsfähig angesehen.

In der Granulozytopoese auftretende Zellen:

Myeloblasten,
Promyelozyten,
neutrophile Myelozyten,
eosinophile Myelozyten,
basophile Myelozyten,
Metamyelozyten (neutrophile jugendliche Granulozyten)
neutrophile stabkernige Granulozyten,
neutrophile segmentkernige Granulozyten,
eosinophile segmentkernige Granulozyten,
basophile segmentkernige Granulozyten.

Myeloblasten, Promyelozyten, Myelozyten und Metamyelozyten wurden zu den teilungsfähigen Zellen gerechnet.

Um karyologische Kurven aufstellen zu können, mußte die Abgrenzung der Mitosephasen erfolgen. Die Einteilung in sechs Phasen ist nach BOLL⁽⁴⁾ durchgeführt worden.

Aus den Zählungen der verschiedenen Präparate wurden Reifungskurven gewonnen, die eine prozentuale Verteilung der Reifungsstufen, getrennt für die Erythro- und Granulozytopoese zeitabhängig wiedergeben. Zusätzlich wurden karyologische Kurven aufgestellt: sie stellen die Mitosephasenverteilung dar. Schließlich haben wir Tabellen der Mitose-Indices einmal für die Erythropoese, dann für die Granulozytopoese und das relative Verhalten der Granulozytopoese zur Erythropoese, den G/E-Index, aufgestellt.

Die Mitose-Indices werden in Promille angegeben.

Das Sternalmark von folgenden Patienten stand uns für unsere Untersuchungen zur Verfügung:

Patientin V.G. (Fall 1)

Einweisung: 3.8.1967

Diagnose: Schwere hypochrome Anämie

Operativ gesichertes Neoplasma ventriculi

Diagnose des Hämatomyelogramms:

Linksverschiebung und Steigerung der Erythropoese bei Eisenmangel. (Keine Eisenspeicherung und keine Sideroblasten in der Berliner-Blau-Färbung)

Therapie bis zur Sternalpunktion:

Der Hausarzt behandelte mit einer Gesamtdosis von 6000 μ Vitamin B₁₂: die Anämie bestand weiter.

Blutbild: (3.8.67)

Erythrozyten 1,41 Mill./mm³

Hb 2,2 g%

Hb_E 15,0 pg

Leukozyten 3800/mm³

Stabkernige 3 %

Segmentkernige 78 %

Lymphozyten 17 %

Monozyten 2 %

Patientin B.S. (Fall 2)

Einweisung: 24.12.1967

Diagnose: Commotio cerebri
hypochrome Anämie

Diagnose des Hämatomyelogramms:

Angeregte Erythropoese bei Eisenmangel.
Eisenfärbung: keine Eisenspeicherung,
keine Sideroblasten, keine Siderozyten.

Blutbild: (24.12.67)

Erythrozyten	3,55 Mill./mm ³
Hb	10,1 g%
Hb _E	28,4 pg

Leukozyten	6000/mm ³
Eosinophile	3 %
Stabk.	5 %
Segm.	67 %
Lymphozyten	21 %
Monozyten	4 %

Patientin H.J. (Fall 3)

Stationäre Aufnahme: 27.12.1966

Diagnose: Morbus Biermer

Tumorzellen im Punktat eines Pleura-
ergusses

Diagnose des Hämatomyelogramms:

Megaloblastenmark

Therapie bis zur Sternalpunktion:

Schon bei der Aufnahme erhielt die
Pat. wegen ihres schlechten Allgemein-
zustandes zunächst zwei Blutkonserven.

Blutbild: (28.12.66)

Erythrozyten	1,81 Mill./mm ³
Hb	5,4 g%
Hb _E	30,0 pg
Leukozyten	7700/mm ³
Eos.	1 %
Segm.	78 %
Lymphozyten	19 %
Monozyten	2 %

Die Diagnose einer perniziösen Anämie wurde durch den
positiven Ausfall des Schillingtests bestätigt: 2,2 %
der verabfolgten Dosis waren im Harn bestimmt worden.

Patientin W.G. (Fall 4)

Stationäre Aufnahme: 27.1.1967

Diagnose: Zustand nach Nephrektomie wegen Hypernephrom

cerebrale Metastasen

Diabetes mellitus

hypochrome Anämie

Diagnose des Hämatomyelogramms:

Tumoranämie: verminderte Erythropoese

mit leichter Retikulumzellvermehrung,

Eisenverschiebung in das Retikulum.

Therapie bis zur Sternalpunktion:

orale Antidiabetica

Blutbild: (27.1.67)

Erythrozyten	4,15 Mill/mm ³
--------------	---------------------------

Hb	10,8 g%
----	---------

Hb _E	26,0 pg
-----------------	---------

Leukozyten	6700/mm ³
------------	----------------------

Eos.	1 %
------	-----

Stabk.	1 %
--------	-----

Segm.	77 %
-------	------

Lymphozyten	16 %
-------------	------

Monozyten	5 %
-----------	-----

Der Eisengehalt im Serum lag bei 51 γ %.

Patientin H.L. (Fall 5)

Stationäre Aufnahme: 27.1.1967

Anamnese: Seit Jahren ist die Einnahme von Medikamenten mit Phenacetingehalt (über 80 Tbl./Monat) wegen anhaltender Kopfschmerzen bekannt.

Diagnose: Akuter Schub einer chron. Pyelonephritis.
Normochrome Anämie

Diagnose des Hämatomyelogramms:
Angeregte linksverschobene Erythropoese
bei Infektanämie. Eisenverschiebung in das
Retikulum.

Therapie bis zur Sternalpunktion:

7,5 g Chloramphenicol

7 Mill. E Penicillin

Blutbild: (6.2.67)

Erythrozyten	2,27 Mill./mm ³
Hb	8,3 g%
Hb _E	31,0 pg
Leukozyten	6000/mm ³
Stabk.	3 %
Segm.	48 %
Lymphozyten	46 %
Monozyten	3 %

Patient K.W. (Fall 6)

Einweisung: 12.1.1967

Diagnose: Fieberhafter grippaler Infekt
passagere postinfektiöse Leukopenie

Diagnose des Hämatomyelogramms:
kein pathologischer Befund nachweisbar.

Blutbild: (13.1.67)

Erythrozyten	4,45 Mill./mm ³
Hb	13,4 g%
Hb _E	29,5 pg
Leukozyten	5300/mm ³
Metamyelozyten	2 %
Stabk.	3 %
Segm.	30 %
Lymphozyten	52 %
Monozyten	13 %

Patientin Z.P. (Fall 7)

Einweisung: 27.6.1967

Diagnose: Verdacht auf eine beginnende hämatologische
Systemerkrankung (pathologische Linksver-
schiebung im Differentialblutbild).
Cholecystopathie

Diagnose des Hämatomyelogramms:
reaktive Plasmazellvermehrung bei chron.
Gallenblasenleiden.

Blutbild: (28.6.67)

Erythrozyten	4,98 Mill./mm ³
Hb	17,6 g%
Hb _E	35,0 pg
Leukozyten	8000/mm ³
Eos.	6 %
Promyelozyten	2 %
Stabk.	8 %
Segm.	48 %
Lymphozyten	29 %
Monozyten	7 %

Blutsenkungsreaktion: 20/36 mm n. W.

Elektrophorese:

Gesamt-Eiweiß = 8,3 g%	
Albumin -	41,0 %
α_1 - Globulin -	6,5 %
α_2 - Globulin -	13,5 %
β - Globulin -	17,0 %
γ - Globulin -	22,3 %

C. ERGEBNISSE

Aus den Knochenmark-Kulturen wurden insgesamt 51000 Zellen differenziert. Für die Kulturansätze der Fälle 1 - 6 hatten wir zunächst eine Zusatzkonzentration von 5 γ /ml Thioctsäure gewählt. Die Gesamtzellzahl, die sich zusammensetzt aus den gezählten Zellen der Kontrollkulturen und der Kulturen, denen Thioctsäure in einer Konzentration von 5 γ /ml zugesetzt worden war, betrug 42000. Außerdem wählten wir für den Fall 1 und Fall 7 eine zehnmal höhere Konzentration an Thioctsäure, d.h. 50 γ /ml. Die Summe der gezählten Zellen aus den Kontroll- und 50 γ /ml Thioctsäure-Zusatzkulturen betrug 9000.

(Anmerkung: eine 72 Std.-Kontrollkultur konnte infolge einer Überwucherung mit Fibroblasten nicht ausgezählt werden.

- Siehe Abb. 7)

Die folgenden Abbildungen zeigen Reifungskurven, in denen die Reifungsstufen der Zellen während der ersten 72 Kulturstunden in Prozent additiv zeitgerecht aufgetragen sind. Für die zeichnerische Darstellung wählten wir folgende Abkürzungen:

Erythropoese: PE = Proerythroblasten, bE = basophile Erythroblasten, pE = polychromatische E., oE = oxyphile E., rE = reife Erythroblasten.

Granulopoese: Mbl = Myeloblasten, Prom. = Promyelozyten, Myel. = Myelozyten, MM = Metamyelozyten, St. = Stabkernige, Seg. = Segmentkernige, eos. = eosinophile Myelozyten bzw. eosinophile Segmentkernige.

Außerdem wurden noch Kennzeichen gewählt:

_____	= Kontrollkulturen
-----	= Kulturen mit 5 γ /ml TS-Zusatz
-----	= Kulturen mit 50 γ /ml TS-Zusatz

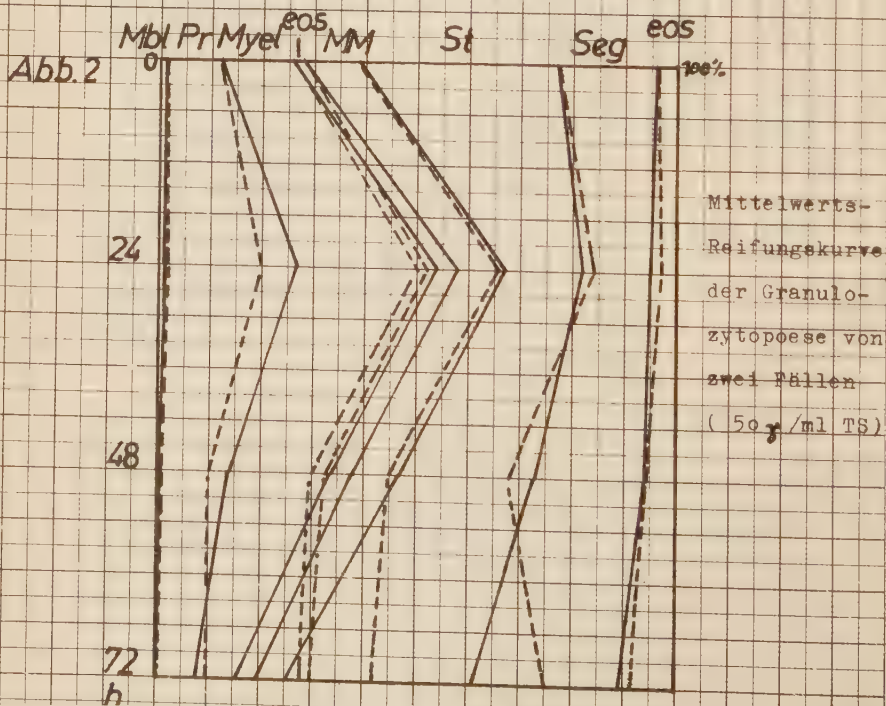
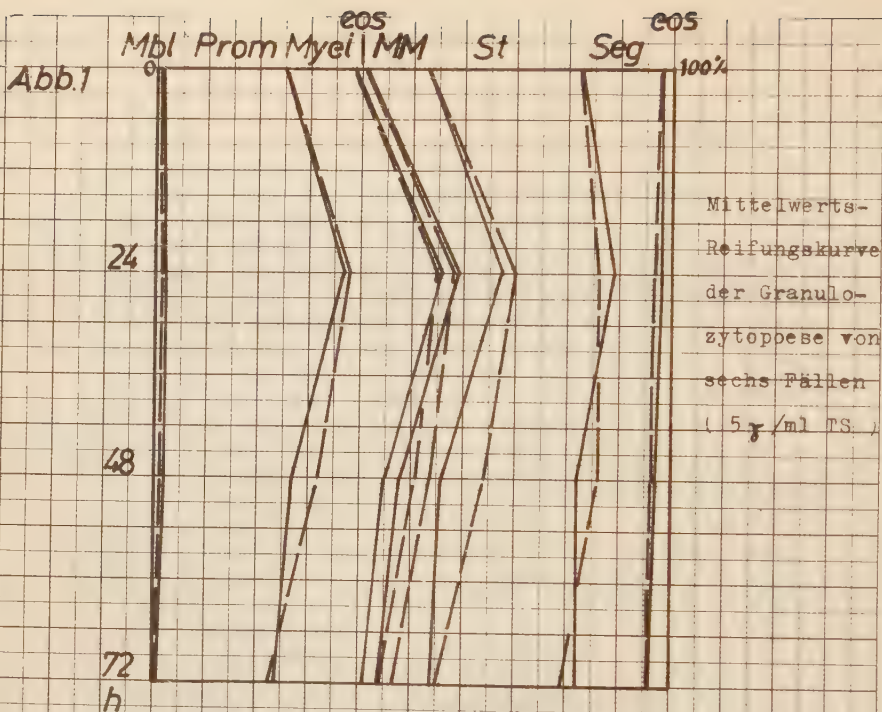
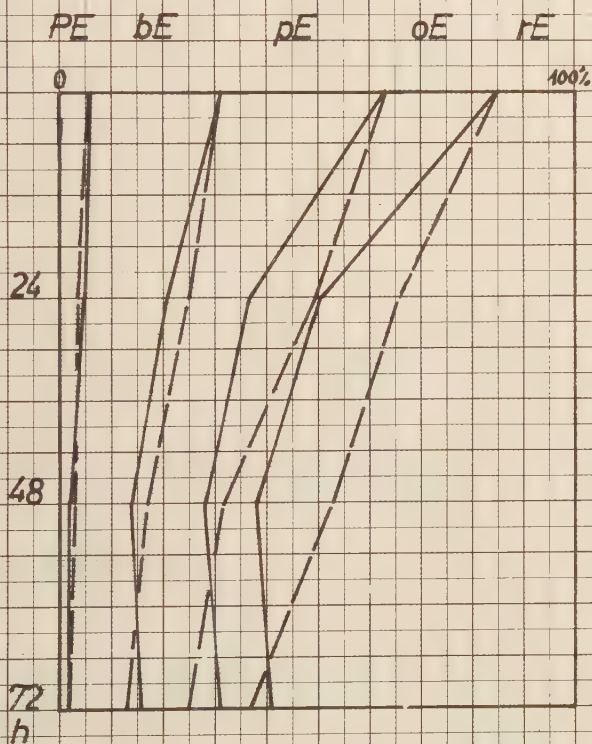


Abb. 3



Mittelwerte - Reifungskurve der
Erythropoese von sechs Fällen (5 γ /ml TS)

Abb.4

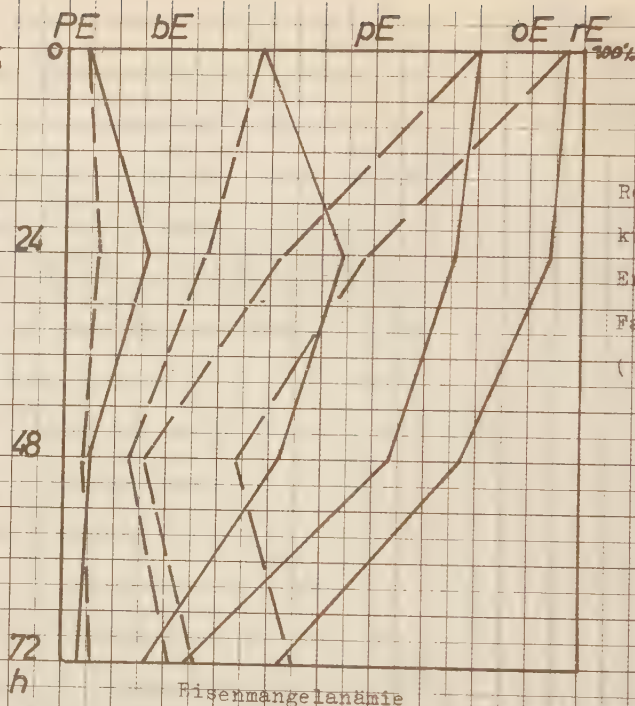


Abb.5

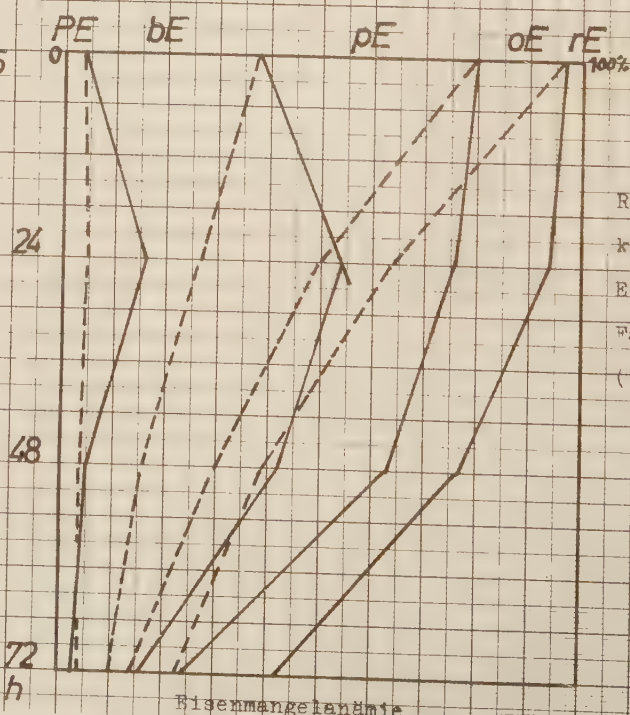


Abb. 6

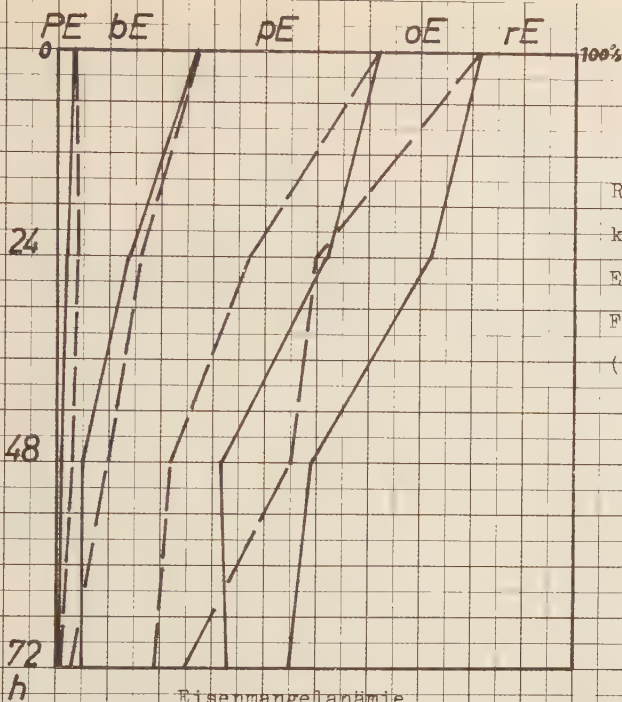


Abb. 7

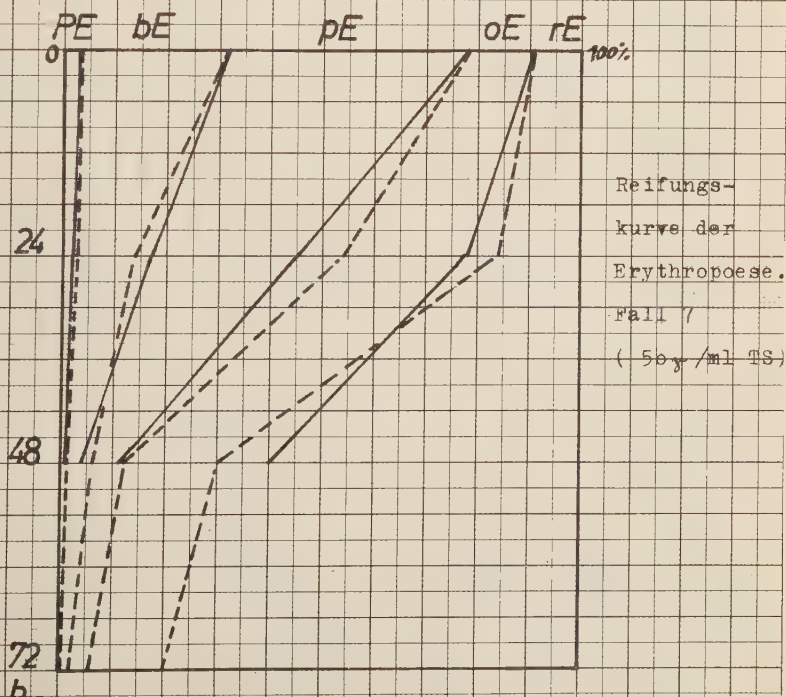
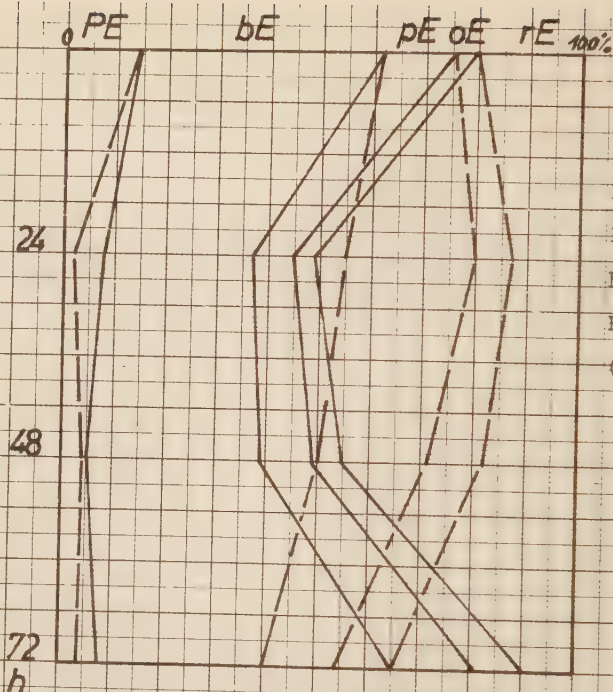
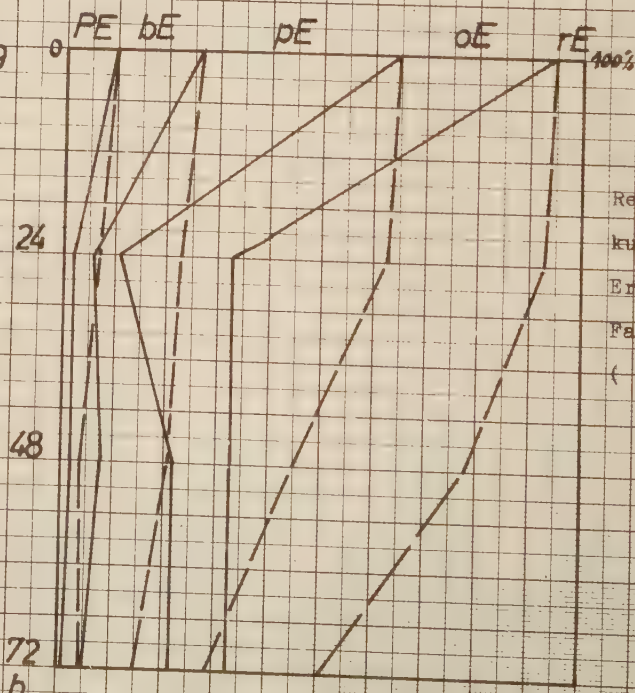


Abb.8

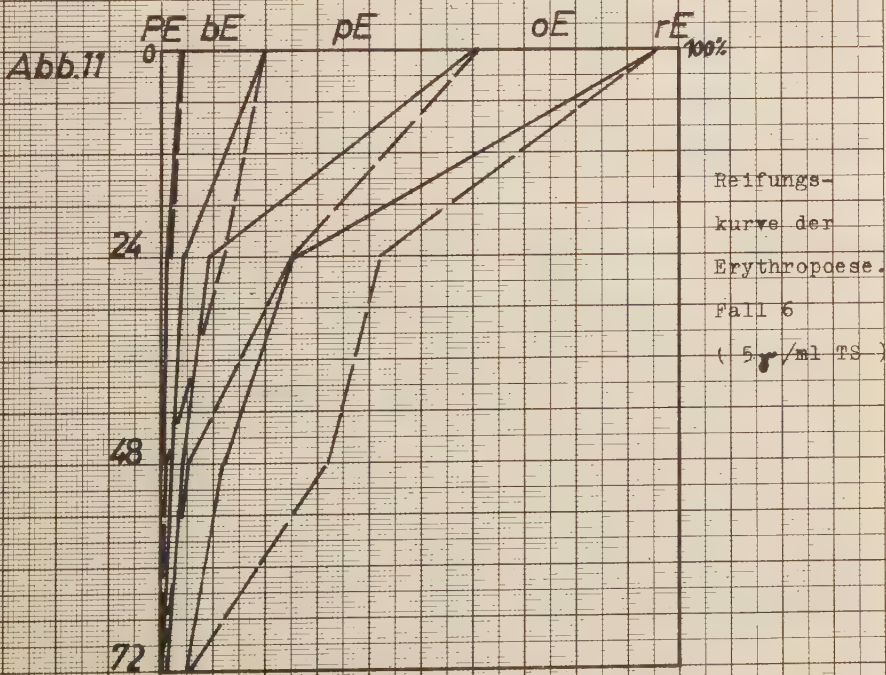
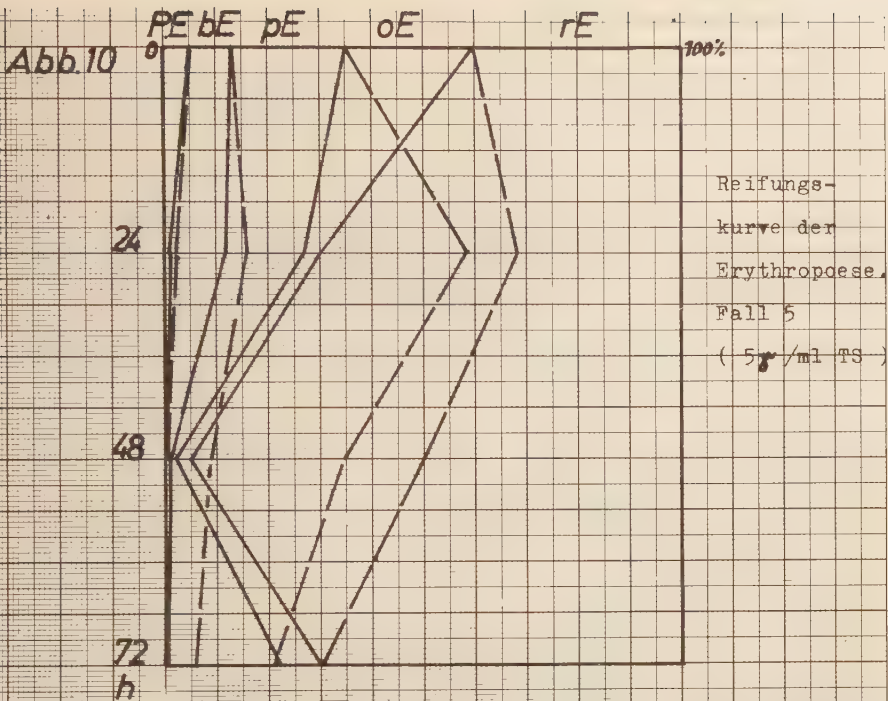


Reifungs-
kurve der
Erythropoese.
Fall 3
(5 $\frac{1}{2}$ /ml TS)

Abb.9



Reifungs-
kurve der
Erythropoese.
Fall 4
(5 $\frac{1}{2}$ /ml TS)



Um eine Signifikanz bestimmen zu können, wurde der χ^2 -Test nach HELMERT PEARSON⁽³⁵⁾ angewendet.

Für die Granulozytopoese mit ihren acht differenzierten Zellformen war die Signifikanz dann gegeben, wenn sie bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1 % bei $\chi^2 > 18$ lag. Für die fünf differenzierten Zellformen der Erythropoese lag die Signifikanz bei gleicher Irrtumsquote bei $\chi^2 > 13$.

Dabei sind:

a = Zellzahl in der Zusatzkultur

b = Zellzahl in der Kontrollkultur

$$m = \frac{a + b}{2}$$

Bestanden in den einzelnen Summen von a und b erhebliche Differenzen, mußte der Faktor $\frac{a}{a + b}$ errechnet werden.

Mit diesem Faktor (er steht in Klammern unter "m") wurde dann die Summe der einzelnen Zellformen multipliziert.

$$\Delta = a - m$$

Aus Δ^2/m ergibt sich die Signifikanz.

Die dem χ^2 -Wert entsprechende Wahrscheinlichkeit P wurde den Tabellen von BELITZ⁽²⁾ entnommen. Da der Freiheitsgrad m für die Erythropoese 5 beträgt, liegt dann eine Signifikanz vor, wenn $P < 0,01$ ist.

Tabelle A

Patientin V.G. (Fall 1) - Erythropoese

Zelltyp	a	b	m	Δ	Δ^2/m
5 γ /ml nach 24 Std.					
PE	30	62	46	16	5,60
bE	82	146	114	32	9,10
pE	70	84	77	7	0,64
oE	71	68	69	2	0,06
rE	<u>172</u>	<u>25</u>	98	74	<u>56,20</u>
	425	385			$\chi^2 > 71,60$
					$P < 10^{-10}$
50 γ /ml nach 24 Std.					
				(0,62)	
PE	38	62	62	24	9,30
bE	134	146	174	40	9,20
pE	150	84	145	5	0,17
oE	80	68	91	9	0,89
rE	<u>233</u>	<u>25</u>	166	67	<u>27,05</u>
	635	385			$\chi^2 > 46,61$
					$P < 10^{-10}$
5 γ /ml nach 48 Std.					
PE	18	13	15	3	0,60
bE	32	97	64	32	15,90
pE	14	109	61	47	36,20
oE	58	48	53	5	0,47
rE	<u>229</u>	<u>82</u>	155	74	<u>35,40</u>
	351	349			$\chi^2 > 88,57$
					$P < 10^{-10}$
50 γ /ml nach 48 Std.					
PE	11	13	12	1	0,01
bE	35	97	66	31	15,00
pE	40	109	74	34	17,70
oE	25	48	36	11	3,36
rE	<u>189</u>	<u>82</u>	135	54	<u>21,60</u>
	300	349			$\chi^2 > 57,61$
					$P < 10^{-10}$

Tabelle A

Zelltyp	a	b	m	Δ	Δ^2/m
5 μ /ml nach 72 Std.					
PE	12	13	7	(0,29)	
				5	3,68
bE	12	67	20	8	3,20
pE	29	41	20	9	4,05
oE	22	90	33	11	3,70
rE	<u>138</u>	<u>295</u>	126	12	<u>1,13</u>
	213	506			$\chi^2 > 15,76$
					P < 0,01

50 μ /ml nach 72 Std.

PE	11	13	12	1	0,08
bE	24	67	45	21	9,75
pE	14	41	27	13	6,58
oE	47	90	68	21	6,49
rE	<u>301</u>	<u>195</u>	298	3	<u>0,09</u>
	397	306			$\chi^2 > 22,93$
					P < 0,0005

Tabelle B

Patientin B.S. (Fall 2) - Erythropoese

Zelltyp	a	b	m	Δ	Δ^2/m
5 μ /ml nach 24 Std.					
PE	12	10	11	1	0,09
bE	53	33	43	10	2,32
pE	100	198	149	49	16,20
oE	61	92	76	15	2,94
rE	<u>224</u>	<u>93</u>	158	66	<u>27,50</u>
	450	426			$\chi^2 > 49,05$
					P < 10 ⁻¹⁰

5 μ /ml nach 48 Std.

PE	8	3	5	3	1,80
bE	28	8	19	9	4,25
pE	40	86	63	23	8,45
oE	78	53	65	13	2,60
rE	<u>179</u>	<u>163</u>	171	8	<u>0,37</u>
	333	313			$\chi^2 > 17,47$
					P < 0,005

Tabelle B

	Zelltyp	a	b	m	Δ	Δ^2/m
5 γ /ml nach 72 Std.					(0,58)	
	PE	2	2	2,3	0,3	0,39
	bE	13	13	15	2	0,26
	pE	80	100	104	24	5,75
	oE	26	37	36	10	2,78
	rE	<u>366</u>	<u>195</u>	325	41	<u>5,15</u>
		487	347			$\chi^2 > 14,33$
						P < 0,02

Tabelle C

Patientin H.J. (Fall 3) - Megalopoese

5 γ /ml nach 24 Std.					(0,66)	
	PE	6	12	12	6	3,00
	bE	148	41	125	23	4,25
	pE	73	11	67	6	0,54
	oE	17	4	14	3	0,65
	rE	<u>37</u>	<u>75</u>	74	37	<u>18,50</u>
		281	143			$\chi^2 > 26,94$
						P < 0,001

5 γ /ml nach 48 Std.					
	PE	11	5		
	bE	147	55		
	pE	68	16		
	oE	35	9		
	rE	<u>65</u>	<u>70</u>		
		326	155		

5 γ /ml nach 72 Std.					
	PE	6	27		
	bE	53	175		
	pE	20	50		
	oE	5	26		
	rE	<u>63</u>	<u>31</u>		
		147	309		

Tabelle D

Patientin W. G. (Fall 4) - Erythropoese

Zelltyp a b m Δ Δ^2/m

5 γ /ml nach 24 Std.

PE	4	2	3	1	0,25
bE	46	32	39	7	1,26
bE	117	41	79	38	18,20
oE	28	5	16	12	8,85
rE	<u>84</u>	<u>186</u>	135	51	<u>19,30</u>
	279	266		χ^2	57,86
				P	< 10 ⁻¹⁰

5 γ /ml nach 48 Std.

(0,66)

PE	3	0	2	1	0,50
bE	23	0	15	8	4,28
pE	76	2	52	24	11,10
oE	43	6	32	11	3,78
rE	<u>147</u>	<u>140</u>	189	42	<u>9,30</u>
	292	148		χ^2	28,96

P < 0,0001

5 γ /ml nach 72 Std.

PE	1	0
bE	10	0
pE	26	39
oE	15	10
rE	<u>104</u>	<u>114</u>
	156	163

Tabelle E

Patientin H.L. (Fall 5) - Erythropoese

5 γ /ml nach 24 Std.

PE	30	11	20	10	5,00
bE	83	20	51	32	20,00
pE	192	25	58	134	30,00
rE	<u>32</u>	<u>327</u>	179	147	<u>119,90</u>
	486	488		χ^2	458,72
				P	< 10 ⁻¹⁰

Tabelle E

	Zelltyp	a	b	m	Δ	Δ^2/m
5 γ /ml nach 48 Std.					(0,57)	
	PE	28	3	18	10	5,56
	bE	109	32	80	29	10,50
	pE	148	76	128	20	3,12
	oE	209	51	148	61	25,05
	rE	<u>146</u>	<u>323</u>	267	121	<u>54,95</u>
		640	485			$\chi^2 > 99,18$
						$P < 10^{-10}$

5 γ /ml nach 72 Std.

PE	22	4
bE	47	15
pE	63	86
oE	110	24
rE	<u>237</u>	<u>156</u>
	459	285

Tabelle F

Patient K.W. (Fall 6) - Erythropoese

5 γ /ml nach 24 Std.					(0,60)	
	PE	0	0	-	-	-
	bE	18	5	14	4	1,15
	pE	22	10	19	3	0,47
	oE	23	26	29	6	1,24
	rE	<u>87</u>	<u>125</u>	127	40	<u>12,55</u>
		250	166			$\chi^2 > 15,41$
						$P < 0,01$

5 γ /ml nach 48 Std.	PE	0	0
	bE	0	1
	pE	7	1
	oE	43	8
	rE	<u>109</u>	<u>74</u>
		159	84

Tabelle F

Zelltyp	a	b	m
5 μ /ml nach 72 Std.			
PE	0	0	
bE	0	0	
pE	0	0	
oE	11	2	
rE	<u>335</u>	<u>40</u>	
	346	42	

Tabelle G

Patientin Z.F. (Fall 7) - Erythropoese

Zelltyp	a	b
50 μ /ml nach 24 Std.		
PE	8	4
bE	46	69
pE	153	128
oE	116	141
rE	<u>56</u>	<u>100</u>
	379	442
50 μ /ml nach 48 Std.		
PE	3	3
bE	12	8
pE	15	18
oE	35	51
rE	<u>200</u>	<u>199</u>
	265	279

Anmerkung zu den Tabellen C - G:

In einigen Tabellen wurde nur die Anzahl der in den Knochenmarkausstrichen aufgefundenen Zelltypen von Kontrollkulturen und TS-Zusatzkulturen gegenübergestellt. Eine Berechnung der Signifikanz war wegen zu geringer Unterschiede der Zellzahlwerte aus Kontrollen und TS-Zusatzkulturen nicht durchgeführt worden.

Zur besseren Beurteilung der experimentellen Untersuchungsergebnisse wurden mehrere Reifungskurven als Mittelwertkurve zusammengefaßt. In der Abb. 1 kann daher das Reifungsverhalten der Granulozytopoese von sechs untersuchten Kontrollkulturen mit den Kulturen, die einen 5 γ /ml TS-Zusatz erhalten haben, verglichen werden. In der Abb. 2 wird das Verhalten von zwei Kontrollkulturen mit zwei 50 γ /ml TS-Zusatzkulturen verglichen. Die Abb. 3 zeigt das Reifungsverhalten der Erythropoese. Die Kontrollkulturen von sechs Fällen und die Kulturen mit 5 γ /ml TS-Zusatz wurden miteinander verglichen.

Da in der Erythropoese die einzelnen Reifungskurven unter 5 γ /ml TS-Zusatz deutliche Unterschiede im Reifungsverhalten zeigten und diese aus der Mittelwertkurve allein nicht zu erkennen wären, wurden sämtliche sechs Kurven auch einzeln abgebildet und ihr Reifungsablauf beschrieben.

Die Abb. 1 und 2 zeigen bis zur 72 Std.-Kultur den Verlauf von Reifungskurven, so wie ihn BOLL⁽⁵⁾ bei der normalen Granulopoese beschrieben hat. Die gewählten TS-Zusatzkonzentrationen haben im Mittel zu keinem deutlich unterscheidbaren Ergebnis im Reifungsverhalten gegenüber ihren Kontrollkulturen geführt. Ebenso verhielt es sich mit dem Ergebnis der Mitose-Indices in der Granulopoese.

Unter den gewählten TS-Zusatzkonzentrationen war die Mitosehäufigkeit gegenüber den Kontrollkulturen nicht vermehrt, und das arithmetische Mittel von sechs bzw. zwei Fällen entsprach den Normwerten der Granulopoese.

Die Abbildung 3 zeigt, daß sich unter dem Thioctsäure-Zusatz ($5 \gamma/\text{ml}$) in der 24 Std.-Kultur die reifen Erythroblasten gegenüber den Kontrollkulturen viel weniger vermehrt haben. Während in den Kontrollkulturen sich die unreifen Blasten - besonders die polychromatischen Zellen - zugunsten der reifen Erythroblasten verminderten, hatte unter dem Zusatz die Zahl der unreifen Erythroblasten noch nicht wesentlich abgenommen. Nach 48 Std. haben sich in der Zusatzkultur zwar die polychromatischen Zellen zugunsten einer Vermehrung der oxyphilen und reifen Erythroblasten vermindert, jedoch erreicht die Zahl der reifen Blasten nicht die Werte der Kontrollkultur. Erst nach 72 Std. hat die Erythropoese unter dem TS-Zusatz die Ausreifung der Kontrollkulturen erreicht oder sogar etwas überschritten.

Insgesamt ist also unter dem $5 \gamma/\text{ml}$ TS-Zusatz eine gegenüber den Kontrollen verlangsamte Ausreifung der Erythropoese anzunehmen.

Die in den folgenden Abbildungen aufgeführten Reifungskurven der Erythropoese von den einzelnen untersuchten Fällen 1 - 6 sollen zeigen, daß das Ergebnis der Mittelwerte (Abb. 3) sich aus folgenden Einzelergebnissen zusammengesetzt hat:

zwei Kulturansätze (Fälle 1 und 2, Abb. 4 und 6) reagierten unter der niedrigen TS-Zusatzkonzentration mit einer beschleunigten Ausreifung. Die Tabellen A und B liefern

für diese beiden Fälle die Signifikanzberechnung. Durch den signifikanten χ^2 -Wert wird bestätigt, daß die reifen Erythroblasten unter dem Zusatz von 5 μ /ml TS zugenommen haben. Diesen beiden Fällen war auch die Diagnose "Eisenmangel bei Blutung" gemeinsam. Eine vermehrte Mitosehäufigkeit unter dem TS-Zusatz ließ sich für beide Fälle durch die Signifikanzberechnung nicht sichern (Tab. J). Infolge der gesteigerten Erythropoese bei Eisenmangel lag der G/E-Index für beide Fälle weit unter dem Wert für normales Knochenmark (Tab. H).

Die übrigen Fälle 3 - 6 (Abb. 8 - 11) zeigen Reifungskurven, die unter dem 5 μ /ml TS-Zusatz eine Hemmung in der Ausreifung gegenüber den Kontrollkulturen erfuhren. Die

-Werte ergaben eine signifikante Verminderung der reifen Erythroblasten unter Zusatz im Vergleich zur Kontrollkultur (Tab. C - F).

Soweit ein Vergleich der Mitose-Indices für die Fälle 3 - 6 möglich war, ließ sich bei der Signifikanzberechnung unter dem TS-Zusatz keine vermehrte Mitosehäufigkeit nachweisen (Tab. J). Mit Ausnahme des Falles 5 lagen die G/E-Indices fast im Bereich des Wertes für normales Knochenmark (Tab. H).

Unter dem Zusatz von 50 μ /ml TS zeigte der Fall 1 (Abb. 5) ebenso wie bei 5 μ /ml TS eine beschleunigte Ausreifung der Erythroblasten. Das Verhalten der reifen Erythroblasten wird durch den signifikanten χ^2 -Wert bestätigt. Eine ge-

steigerte Mitosehäufigkeit unter TS-Zusatz ließ sich in der Signifikanzberechnung nicht nachweisen.

Der Fall 7 zeigte nach 24 Std. eine Hemmung der Ausreifung der Erythroblasten (Abb. 7) unter einem 50 γ /ml TS-Zusatz, während das weitere Reifungsverhalten keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle ergeben hat.

Aus den Darstellungen der Einzelabbildungen geht hervor, daß unter beiden gewählten Zusatzkonzentrationen eine beschleunigte Ausreifung der Erythroblasten dann nachweisbar war, wenn die Diagnose des kultivierten Knochenmarks "Eisenmangel bei Blutung" lautete.

Eine karyologische Kurve wurde für die Mitosen der Kontroll- und 5 γ /ml TS-Zusatzkulturen der Erythropoese aufgestellt.

Die Zahl der aufgefundenen roten Mitosen in den Kontrollkulturen mit 25 Mitosen und in den 5 γ /ml TS-Zusatzkulturen mit 49 Mitosen war so gering, so daß wir die karyologische Kurve mit der absoluten Zahl der Mitosen aufstellen mußten (Abb. 12).

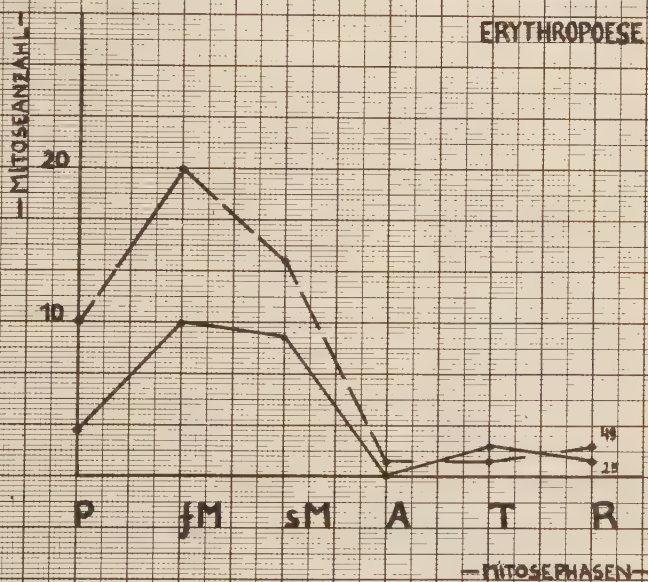
Bei dieser zeichnerischen Darstellung wurden folgende Abkürzungen verwendet:

P = Prophase	A = Anaphase
fM = frühe Metaphase	T = Telophase
sM = späte Metaphase	R = Rekonstruktionsphase

————— Kontrollkultur

----- Kultur mit 5 γ /ml TS

Abb. 12



Aus der Darstellung der karyologischen Kurve geht hervor, daß in der Zusatzkultur zwar mehr Mitosen als in den Kontrollen gefunden wurden, daß aber in der Verteilung der Mitose-Phasen sich keine nennenswerten Abweichungen von den Kontrollen ergeben haben.

In der Tabelle H sind die G/E-Indices von Kontrollkulturen und beiden Thiocytasäure-Zusatzkulturen wiedergegeben. Aus den Mittelwerten der einzelnen G/E-Indices ist zu erkennen, daß der Index des Originalausstrichs mit 2,5 nur wenig unter dem Wert für "normales" Knochenmark liegt. Der Mittelwert der G/E-Indices wird aus nur fünf Fällen ermittelt, da der Fall 6 (Klin. Diagnose: relative Lymphozytose bei einem grippalen Infekt) in den Kontrollkulturen nach 48 und 72 Std. extrem hohe Indices liefert, so daß er für eine Mittelwertsbildung zu sehr aus dem Rahmen fällt.

Der G/E-Index erreicht in den Kontrollkulturen schon nach 48 Std. den höchsten Wert und sinkt nach 72 Std. auf 1,9 ab, während in der 5 γ /ml TS-Zusatzkultur der Index zunächst weniger stark ansteigt und erst nach 72 Std. mit 2,3 den Wert erlangt, der fast dem G/E-Index des Originals entspricht.

Unter dem 50 γ /ml TS-Zusatz liegen die G/E-Indices in der gleichen Größenordnung wie in den Kontrollkulturen: die Werte erreichen mit 1,7 nicht den G/E-Index für "normales" Knochenmark infolge der gesteigerten Erythropoese bei Eisenmangel bei Fall 1 (G/E = 1,2).

Tabelle H

G/E - Index

Original- ausstrich			Kontrolle Std.			5 γ /ml TS Std.		
		24	48	72		24	48	72
Fall 1	1,2	1,0	1,6	0,7		0,9	1,5	2,4
Fall 2	1,7	1,1	2,1	1,3		1,0	1,6	1,0
Fall 3	2,7	4,8	3,5	1,7		2,3	1,9	4,8
Fall 4	5,4	2,3	4,6	4,2		2,7	2,7	4,7
Fall 5	1,6	0,7	0,9	1,8		0,6	0,6	0,9
Arithm.M.	2,5	1,9	2,5	1,9		1,5	1,6	2,3
50 γ /ml TS								
Fall 1	1,2	1,0	1,6	0,7		0,4	1,9	0,7
Fall 7	2,1	0,7	1,7	---		0,8	1,4	1,0
Arithm.M.	1,7	0,9	1,7	0,7		0,6	1,7	0,8

Zu einem Vergleich der roten Mitose-Indices unter dem Thioctsäure-Zusatz gegenüber den Kontrollmitosen wurde der χ^2 -Test zur Berechnung der Signifikanz in einer etwas abgewandelten Form nach BELITZ⁽²⁾ angewendet.

Erklärung der Symbole:

B_M = Beobachtungswert der Mitosen

B_N = Beobachtungswert der "Nicht"-Mitosen

E_M = Erwartungswert der Mitosen

E_N = Erwartungswert der "Nicht"-Mitosen

Berechnung von E:

$$E = \frac{\text{Summe der Mitosen}}{\text{Summe der Gesamtzellen} \times \text{Beobachtungswert}}$$

$$\chi^2 = \sum \frac{(B - E)^2}{E}$$

Die dem χ^2 -Wert entsprechende Wahrscheinlichkeit P wird in den Tabellen von BELITZ⁽²⁾ aufgesucht. Der Freiheitsgrad m beträgt 1. Eine Signifikanz liegt vor, wenn $P < 0,01$ ist.

Die Tabelle I gibt die Anzahl der aufgefundenen roten Mitosen aus Kontrollkulturen und 5 γ /ml und 50 γ /ml TS-Zusatzkulturen - bezogen auf die Gesamtzahl der teilungsfähigen Erythroblasten - wieder.

Tabelle I

	<u>Kontrollkultur</u>			<u>5 γ/ml TS-Zusatzkultur</u>		
	Std.			Std.		
	24	48	72	24	48	72
Fall 1	5/360	3/267	4/211	4/253	1/122	1/ 95
Fall 2	2/332	1/149	2/149	3/223	2/152	2/118
Fall 3	1/ 68	1/ 85	4/278	3/249	4/291	1/ 84
Fall 5	2/161	1/162	1/129	10/454	9/494	5/242

	<u>Kontrollkultur</u>			<u>50 γ/ml TS-Zusatzkultur</u>		
	Std.			Std.		
	24			24		
Fall 1	5/360				9/402	
	Std.			Std.		
	24	48	72	24	48	72
Fall 7	1/343	1/ 80	-	1/323	1/ 65	-

Tabelle J

Fall 3 (24 Std.)	B_M	B_N	B_{M+N}	E_M	E_N
Kontrolle	1	67	68	0,85	67,15
Zusatz (5 γ /ml)	3	246	249	3,15	245,85
$\chi^2 > 0,11$					
$P < 0,70$					

Fall 3 (48 Std.)

Kontrolle	B_M	B_N	B_{M+N}	E_M	E_N
	1	84	85	1,15	83,85
Zusatz (5 γ /ml)	4	287	291	3,85	287,15
$\chi^2 > 2,34$					
$P < 0,15$					

Tabelle J

Fall 5 (24 Std.)

	B_M	B_N	B_{M+N}	E_M	E_N
Kontrolle	2	159	161	3,12	157,88
Zusatz (5g/ml)	10	444	454	8,88	445,12
$\chi^2 > 0,54$					
$P < 0,45$					

Fall 5 (48 Std.)

	B_M	B_N	B_{M+N}	E_M	E_N
Kontrolle	1	161	162	2,5	159,5
Zusatz (5g/ml)	9	485	494	7,5	486,5
$\chi^2 > 1,22$					
$P < 0,30$					

Fall 5 (72 Std.)

	B_M	B_N	B_{M+N}	E_M	E_N
Kontrolle	1	128	129	2,1	126,9
Zusatz (5g/ml)	5	237	242	3,9	238,1
$\chi^2 > 0,84$					
$P < 0,30$					

Fall 1 (24 Std.)

	B_M	B_N	B_{M+N}	E_M	E_N
Kontrolle	5	355	360	6,6	353,4
Zusatz (50g/ml)	9	393	402	7,4	394,6
$\chi^2 > 0,74$					
$P < 0,30$					

Zusammenfassung der Ergebnisse in vitro:

1. Beide von uns geprüften Thioctsäure-Zusatzkonzentrationen haben keinen Einfluß auf die Ausreifung der Granulocytopoese ausgeübt. Thioctsäure bewirkte keine deutliche Änderung des weißen Mitose-Index sowie des G/E-Index gegenüber den Indices der Kontrollkulturen.
2. In vier von sechs untersuchten Fällen haben 5 μ /ml TS zu einer Ausreifungshemmung in der Erythropoese geführt. Zwei Fälle - die Knochenmark-Diagnose lautete "gesteigerte Erythropoese bei Eisenmangel" - reagierten unter dem 5 μ /ml TS-Zusatz mit einer beschleunigten Ausreifung der Erythropoese gegenüber den Kontrollkulturen.
3. Bei einem Kulturansatz mit der Diagnose "Eisenmangel" bewirkten 50 μ /ml TS auch eine beschleunigte Ausreifung der Erythropoese, während ein Kulturansatz mit einer anderen Diagnose unter der gleichen TS-Zusatzdosis kein geändertes Reifungsverhalten gegenüber der Kontrollkultur gezeigt hatte.
4. Bei der Prüfung auf Signifikanz für die aufgefundenen Erythroblasten-Mitosen ließ sich zeigen, daß in den Fällen von Ausreifungshemmung der Erythropoese die geringe Zunahme der Mitosehäufigkeit unter dem 5 μ /ml TS-Zusatz gegenüber den Kontrollmitosen nicht statistisch signifikant war. In den Fällen mit einer beschleunigten Ausreifung der Erythropoese unter dem 5 μ und 50 μ /ml TS-Zusatz ließ sich für die Erhöhung des Mitose-Index eine Signifikanz nicht nachweisen.
5. Die Mittelwerte der G/E-Indices aus fünf Fällen mit 5 μ /ml TS-Zusatz waren gegenüber den Kontrollkulturen unverändert geblieben.
Die G/E-Indices von zwei Fällen mit 50 μ /ml TS zeigten ebenfalls keine Änderung gegenüber den Kontroll-Indices.

DISKUSSION

Die Durchsicht der Literatur über Thioctsäure zeigt, daß sie bei verschiedenartigen Krankheiten wie akuten und chronisch entzündlichen Lebererkrankungen, dem hepatischen Koma und bei einigen Schwermetallvergiftungen therapeutisch verwendet wird.

Berichte, die in einem Zusammenhang mit dem blutbildenden Gewebe stehen, finden sich in der zur Verfügung stehenden Literatur über Thioctsäure nicht.

Wir hielten die Thioctsäure für eine biologisch so interessante Substanz, daß wir ihren Einfluß auf das Knochenmark in vitro prüfen wollten. Die Zusatzdosis wählten wir nach TAKENOUCHI⁽³³⁾, der den physiologischen Gehalt an Thioctsäure mit annähernd 15 μ /ml Serum bestimmte. Von ROTH⁽²⁹⁾ wurden therapeutische Dosierungen mitgeteilt, die zwischen 10 und 60 mg pro 70 kg Körpergewicht lagen. In neueren Veröffentlichungen über die Therapie von chronischen Hepatitiden mit Thioctsaure wird auf eine erhebliche Erhöhung der therapeutisch wirksamen Dosis hingewiesen⁽¹⁷⁾. Wir setzten die Thioctsäure den Kulturen direkt zu und hielten eine zusätzliche Dosis von 5 μ /ml TS zunächst für eine optimale Wirkkonzentration.

Wegen des nur mäßigen Effektes erhöhten wir die Dosis für zwei weitere Kulturansätze auf 50 μ /ml Thioctsäure.

Auf die Granulozytopoese hatten die beiden gewählten Thioctsäure-Zusatzmengen keinen proliferationsfördernden Einfluß ausgeübt. Die Mittelwerts-Reifungskurven unter 5 μ und 50 μ /ml TS-Zusatz verliefen fast identisch mit den Kurven

der Kontrollkulturen - eine Signifikanzberechnung erübrigte sich daher -, die Mitose- und G/E-Indices blieben unverändert gegenüber den Kontrollkulturen.

Zu der von RAUSCH⁽²²⁾ mitgeteilten Beobachtung, der bei der Behandlung mehrerer dekompensierter perniziöser Anämien einen Anstieg der Leukozytenwerte unter Thioctsäure im peripheren Blutbild feststellte, fand sich bei unserer Untersuchung in vitro kein Korrelat.

In vier versuchten Fällen hatte der Thioctsäure-Zusatz nicht zu dem von uns erhofften stoffwechselfördernden Einfluß auf die Erythropoese geführt. Es ließ sich durch Prüfung der Reifungskurven auf Signifikanz zeigen, daß es durch den 5 μ /ml TS-Zusatz sogar zu einer Hemmung der Ausreifung der Erythropoese gegenüber den Kontrollkulturen gekommen war. Da die Mitose-Indices und die karyologische Kurve unter 5 μ /ml TS-Zusatz sich gegenüber den Kontrollwerten nicht veränderten, kann jedoch eine hemmende Einflußnahme auf die Regeneration der Erythroblasten durch die Thioctsäure nicht festgestellt werden.

Eine Mitteilung von RAUSCH⁽²²⁾, der unter einer Thioctsäurebehandlung bei einer perniziösen Anämie einen Anstieg der Erythrozytenzahlen und eine Retikulozytenkrise beobachtet hatte, konnten wir während 3 Tage in vitro nicht bestätigen. (Reifungskurve eines Morbus Biermer (Abb.8)). Während die Kontrollkulturen nach 24 und 48 Std. noch eine gewisse Tendenz zur Ausreifung zeigten, hatte sich unter dem Thioctsäure-Zusatz eine Hemmung der Ausreifung der

Erythroblasten eingestellt.

Aus den Einzelabbildungen 4 und 6 geht hervor, daß die Fälle 1 und 2, denen die Knochenmarkdiagnose - gesteigerte Erythropoese auf Grund eines Eisenmangels - gemeinsam war, ein von den oben beschriebenen vier Fällen abweichendes Reifungsverhalten zeigten. Beide Knochenmarkkulturen, die durch eine Blutung bedingte Zeichen des Eisenmangels aufwiesen, verhielten sich in der 3-Tage-Kultur gleichartig und zeigten gegenüber den Kontrollkulturen eine beschleunigte Ausreifung der Erythroblasten unter dem 5 γ /ml TS-Zusatz. Die im Fall 2 gesteigerte Mitosehäufigkeit gegenüber den Kontrollmitosen war statistisch nicht zu sichern, so daß eine Regenerationsförderung durch den Thioctsäurezusatz nicht zu beweisen ist.

Hatten wir bei dem Kulturansatz des Falles 1 mit den Zeichen eines Eisenmangels eine 10-fach höhere Thioctsäure-Dosis zugesetzt, erhielten wir ebenfalls eine Reifungskurve, die gegenüber den Kontrollkulturen zu allen Kulturzeiten eine beschleunigte Ausreifung der Erythropoese zeigte (Abb. 5). Auch hier war nach 24 Std. in der TS-Zusatzkultur der rote Mitose-Index gegenüber den Kontrollmitosen der Erythropoese erhöht, ohne daß sich eine Signifikanz sichern ließ. Unter dem 50 γ /ml TS-Zusatz unterscheidet sich das Verhalten der Reifungskurve somit nicht von den Reifungskurven, wie wir sie bei Knochenmarkkulturen mit Eisenmangel schon mit einem 5 γ /ml TS-Zusatz erhalten haben.

Wir ziehen daraus den Schluß, daß die Thioctsäure in den von uns verwendeten Dosierungen nur bei Eisenmangel-anaemien eine Reifungsbeschleunigung der Erythropoese bewirkt, und sich eine Tendenz zur Regenerationsförderung - wenn auch statistisch nicht zu sichern - abzeichnet, hierbei also die ganze Proliferation stimuliert ist.

Es wäre zu diskutieren, ob eine beschleunigte Ausreifung der Erythropoese unter einer Thioctsäure-Applikation in den Kulturen, die einen Eisenmangel hatten, durch eine Einflußnahme auf den Eisenstoffwechsel bewirkt wurde.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Da Thioctsäure (α -Liponsäure) bei der oxydativen Decarboxylierung von α -Ketonsäuren als Coferment beteiligt ist und damit Einfluß auf den Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel und indirekt auch auf den Eiweißstoffwechsel nehmen kann, sollte die direkte Wirkung von zwei im therapeutischen Bereich liegenden Konzentrationen auf die Hämatopoese in der Knochenmarkkultur untersucht werden.

Aus den Differential-Zählungen der 3-Tage-Kulturen wurden Reifungskurven und eine karyologische Kurve aufgestellt und der Mitose-Index und der G/E-Index berechnet.

Die Auswertungen haben ergeben, daß die Proliferation der Zellen der Granulozytopoese durch Thioctsäure keine nachweisbaren Änderungen erfahren hat.

In vier untersuchten Fällen hat der 5 γ /ml Thioctsäure-Zusatz einen hemmenden Einfluß auf die Ausreifung der Erythroblasten ausgeübt. Da die Häufigkeit der aufgefundenen Erythroblasten-Mitosen unter dem TS-Zusatz sowie in den Kontrollkulturen gleich blieb und auch die karyologische Kurve für die Mitosen der Erythropoese unter dem TS-Zusatz sich nicht von der Kurve der Kontrollmitosen unterschied, scheint die Verzögerung der Ausreifung der Erythropoese nicht über eine Hemmung der Mitosen zustande gekommen zu sein.

Beide Thioctsäure-Zusatzkonzentrationen führten bei Kulturen mit Eisenmangelerscheinungen zu einer statistisch gesicherten beschleunigten Ausreifung der Erythropoese und zu einer leichten Förderung der Regeneration, so daß es lediglich bei Eisenmangelanämien zu einer Proliferationssteigerung der Erythropoese unter Thioctsäure kam.

F. LITERATURVERZEICHNIS

1. ALBRECHT, M. u. I. BOLL: "Untersuchungen über die Einwirkungen von Colchicin, arseniger Säure, Stickstofflost und Aethylurethan auf menschliches Knochenmark in vitro"
Ärztl. Wschr. 5, 485 (1950)
2. BELITZ, H.J.: Sonderdruck aus "Der Mathematikunterricht"
Heft 3 S. 102-103 Ernst-Klett-Verlag
Stuttgart 1960
3. BOLL, I. und G. FUCHS: "Vereinfachtes Verfahren zur kurzfristigen Kultivierung von menschlichem Knochenmark in vitro"
Blut 7, 257 (1961)
4. BOLL, I. und G. MERSCH: "Morphologische Untersuchungen zur Proliferationskinetik der normalen und pathologischen Erythropoese in vitro"
Blut 17, 193 (1968)
5. BOLL, I.: "Granulozytopoese unter physiologischen und pathologischen Bedingungen"
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1966)
6. BRADY, O., STATMAN, E.R.: "Enzymatic thioltransacetylation"
J.Biol.Chem. 211, 621 (1954)
7. BULLOCK, M.W.: "Syntheses in the Thioctic Acid Series"
J.Amer.Chem.Soc. 76, 1928 (1954)
8. BUTTURINI, U.: "Prime osservazioni cliniche sperimentali sull'acido tioctico"
Atti Simp.Inter.Ac.Tioctico Napoli 1955,
S. 221
9. CALVIN, M.: "Chemische und photochemische Reaktionen von Thioctsäure und verwandter Disulfide"
10. DEWEY, V.C.: "The lipotrope factor"
Proc. Soc. Exp. Biol.Med. 46, 482 (1941)

11. DONATELLI, L.: "Prime osservazioni cliniche sperimentali sull'acido tiotico"
Atti Simp. Inter. Ac. Tioctico Napoli 1955
12. GOEDDE, H.W.: "Untersuchungen zur Substratspezifität der Liponsäure-Dehydrogenase",
Biochem. Zschr. 339, 23 (1963)
13. GRISEBACH, H.: "Chemie und Biochemie der α -Liponsäure",
Angewandte Chemie 68, 554 (1956)
14. GRUNERT, R.: " α -Lipoic Acid and Heavy-Metal Inhibition of the Pyruvic Oxidase Enzyme System of *S.faecalis*"
Arch. Biochem. Biophys. 86., 190 (1960)
15. GUIRARD, H.: "Testbacterium *Lactobacillus lactis casei*"
Arch. biochem. 9, 381 (1946)
16. GUNSALUS, I.C.: "The Mechanism of Enzyme Action"
1954, 545 Edit. W.D. Mc Elroy and B. Blass,
John Hopkins Press, Baltimore
17. MÖLLER, E.: "Behandlung chronischer Leberkrankheiten mit Thioctsäure".
Med. Klinik, 62, 384 (1967)
18. OKANE und GUNSALUS: "Testbacterium *Streptococcus faecalis*"
J. Bacteriol. 56, 499 (1948)
19. OJI, K.: Referat anlässlich eines Thioctsäure-Symposiums, 6. Internat. Kongr. Inn. Med.
Basel, 1960
20. PATTERSON, E.L. und STOKSTAD, E.L.R.: "The Isolation of Protogen"
J. Amer.Chem. Soc. 76, 1823 (1954)
21. PETZOLD, H.: "Die Wirkung der Thioctsäure auf die Verfettung der regenerierenden Rattenleber"
Acta biol. med. Germ. 3,1 (1959)
22. RAUSCH, F.: "Klinische Beobachtungen mit Thioctinsäure"
Arzneimittelforschung 5, 32 (1955)

23. RAUSCH, F.: "Therapeutische Anwendung von Thioctsäure"
Verhandlung Dt. Ges. Inn. Med. 1954, 794
24. REED, L.J.: "Crystalline Acid: A Catalytic Agent
Associated with Pyruvate Dehydrogenase"
Science 114, 93 (1951)
25. REED, L.J.: "Identification of the Carbon Skeleton
of α -Lipoic Acid"
26. REDETZKI, H.: "Einfluß der Thioctinsäure auf den
Brenztraubensäure- und Ketoglutarsäurespiegel
bei Leberkrankheiten.
Klin. Wschr. 34, 845 (1956)
27. REISS, O.K.: "Restoration of Pyruvate Utilization in
Heart Sarkomes by α -Lipoic Acid"
J. Biol. Chem. 233, 789 (1958)
28. ROSENBERG, H.R.: "Effect of α -Lipoic Acid on Vitamin C
and Vitamin E Definiencies"
Arch. Biochem. 80, 86 (1959)
29. ROTH, A.: "Klinische Untersuchungen mit Thioctinsäure"
Rev. med. Suisse rom., 77, 574 (1957)
30. SANADI, D.R.: " α -Ketoglutaric Dehydrogenase"
J. Biol. Chem. 234, 183 (1959)
31. STEIGMANN, F.: "Thioctsäure in der Behandlung des
Coma hepaticum"
Fed. Proc. 15, 487 (1956)
32. TAKAHASHI, T.: "The Effect of Thioctic Acid on
Experimental Liver Damage"
3. Jap. Symp. on Thioctic Acid, May 1960, Osaka.
33. TAKENOUCHI, K.: "Untersuchungen des Thioctsäure-
stoffwechsels bei Hautkrankheiten" (Dt. Über-
setzung)
J. Vitaminol. (Kyoto) 8, 99 (1962)
34. THOMPSON, M.: "Addition of Thioctic Acid to a Plan
for Management of Hepatic Insufficiency"
Amer. J. Med. 21, 131 (1956)
35. Wissenschaftliche Tabellen:
J.R. Geigy, Basel (1955).

Studie im Rahmen der Assoziation Haematologie Euratom-
GSF, Nr. 031 - 64 - 1 Biad, unterstützt durch die DFG

LEBENS LAUF

Am 19. Oktober 1941 wurde ich in Berlin als Sohn des Regierungsrates Karl Scheel und seiner Ehefrau Irmgard, geb. Döpfer, geboren. Mein Vater verstarb bereits 1942 an den Folgen einer Gehirnoperation.

In Berlin besuchte ich zunächst die 13. Grundschule und anschließend das Goethe-Gymnasium in Berlin-Wilmersdorf. Zwei Jahre besuchte ich die Menzel-Schule in Berlin-Tiergarten und bestand dort die Reifeprüfung (1962).

Seit dem Wintersemester 1962/63 studierte ich an der Freien Universität Berlin Humanmedizin. 1963 heiratete ich die Drogistin Christel, geb. Rieck. Im September 1963 konnte ich die Geburt meines Sohnes Christoph Scheel bekannt geben. Im Sommer 1963 legte ich das Vorphysikum und im Herbst 1965 das Physikum an der Freien Universität Berlin ab. Das Medizinische Staatsexamen beendete ich ebenfalls an der Freien Universität Berlin im Frühjahr 1969.

Nach einer einjährigen Medizinalassistentenzeit im Krankenhaus Neukölln erhielt ich im Mai 1970 die Approbation.

Seit dem November 1970 bin ich an der Anästhesie-Abteilung des Neuköllner Krankenhauses tätig.

Druck:

Der Präsident der Freien Universität Berlin
- Universitätsdruckerei -

1 Berlin 41, Kelchstraße 31

